

**Untersuchungen zur Genetik
der menschlichen Serum-Paraoxonase
an Hand von 13 Familien
aus dem Raum Erlangen**

Vorgelegt

von

Helga Eckstein

aus

Oberwellitzleithen

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H. -B. Wuermeling

Untersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase

an Hand von 13 Familien aus dem Raum Erlangen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem

Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

HELGA ECKSTEIN

aus Oberwellitzleithen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin

der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Professor Dr. E. Rügheimer

Referent : Professor Dr. Dr. M. Geldmacher- v. Mallinckrodt

Korreferent : Professor Dr. H. -B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung : 09. Dezember 1976

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	2
1. Wirkungsweise des E 605 bzw. E 600 (= Paraoxon) auf Cholinesterase	2
2. Hydrolyse und Hemmwirkung des Paraoxon	4
3. Polymorphismus der Serumcholinesterase und der Serumparaoxonase	13
B. Problemstellung	18
C. Experimentelle Untersuchungen	19
1. Versuchspersonen	19
2. Methodik zur Messung der Serumcholinesterase- Restaktivität mit Butyrylcholinjodid als Substrat in der Warburg-Apparatur	19
3. Versuchsergebnisse	23
D. Diskussion und Zusammenfassung	27
E. Literaturverzeichnis	29

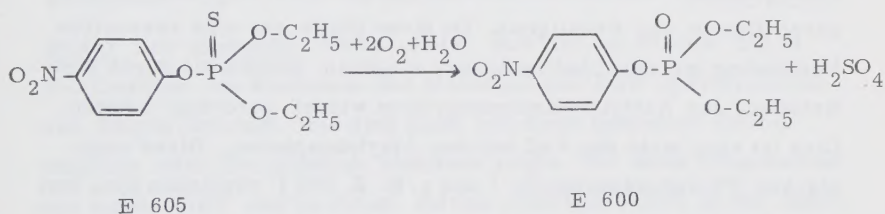
A. Einleitung

1. Wirkungsweise des E 605 bzw. E 600 auf Cholinesterase

An Hand von zahlreichen Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Aktivität der menschlichen Serumcholinesterase relativ konstant ist. Sie kann jedoch durch Krankheiten (akute Hepatitis, Carzinome, Myelose, Polyarthrit, Tuberkulose), verschiedene Pharmaka (Prostigmin, Physostigmin, Novocain, Ergotamin, Chinin, Morphin) und Gifte gehemmt werden.

Bei den Giften haben vor allem die organischen Phosphorsäureester eine starke Wirkung. Der 1944 von Schrader entwickelte Phosphorsäureester E 605 spielt nicht nur in der Schädlingsbekämpfung eine große Rolle, sondern übt auch auf den menschlichen Organismus eine stark toxische Wirkung aus.

Aus E 605 (Parathion, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat) entsteht im Warmblüterorganismus sein Oxidationsprodukt E 600 (Paraaxon, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) durch Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff:



E 600 besitzt ebenfalls eine ausgezeichnete insektizide und akarizide Wirkung. Seine hohe Toxizität zog der praktischen Anwendung als Systeminsektizid jedoch enge Grenzen. Paraaxon wird als

Mioticum und Anitglaucomatosum unter der Bezeichnung Mintacol in der Augenheilkunde verwendet.

Die stark toxische Wirkung des E 600 beruht zum großen Teil auf einer Blockierung der Cholinesterasen im Zentralnervensystem und an den motorischen Endplatten. Die Entdeckung der starken Cholinesterasehemmung durch Pharmaka und Gifte hat sich insbesondere bei der Erforschung der Rolle des Acetylcholins und der Cholinesterasen in der Nervenphysiologie als äußerst wichtig erwiesen.

Der physiologische Erregungsvorgang der Skelettmuskelzelle wird eingeleitet durch eine Freisetzung von Acetylcholin im Bereich der neuromuskulären Synapse (= Verknüpfungsstelle zwischen motorischer Nervenfasern und Skelettmuskelzelle). Das freigesetzte Acetylcholin löst die Änderungen der Membraneigenschaften des Sarkomems, die schließlich zur Kontraktion führen, aus, wird jedoch selbst innerhalb von Millisekunden durch die in großer Menge in der Endplatte lokalisierte Acetylcholinesterase hydrolysiert und biologisch inaktiviert. Die Acetylcholinesterase aber kann auch durch verschiedene Pharmaka und Gifte reversibel oder irreversibel gehemmt werden. Zu den reversiblen Esterasehemmern gehören Eserin und Prostigmin. Da diese Stoffe nur eine reversible Verbindung mit der Cholinesterase eingehen, können sie durch eine Erhöhung der AcetylcholinKonzentration wieder verdrängt werden. Dies ist aber nicht der Fall bei den Alkylphosphaten. Diese organischen Phosphorsäureester (wie z. B. E 600) verbinden sich fest mit der Cholinesterase und hemmen sie damit irreversibel. Da der Körper nicht in der Lage ist, seine Cholinesterase rasch zu ersetzen, steigt der Acetylcholinspiegel in Gewebe und Blut laufend an, führt zur Dauerdepolarisation an vielen erregbaren Membranen und damit zum Erlöschen lebenswichtiger cholinergischer Er-

regungstransmissionen, was den Tod des vergifteten Organismus durch Lähmung der Atemmuskulatur oder Herzstillstand durch Acetylcholinanhäufung zur Folge hat.

Zwischen den einzelnen Phosphorsäureestern bestehen in der Hemmwirkung erhebliche quantitative Unterschiede. Der Cholinesterasehemmwert von E 600 liegt z.B. bei $10^{-7,9}$ M für eine 50 %ige Cholinesterasehemmung, während der Cholinesterasehemmwert für Methylparathion vergleichsweise bei 10^{-4} M liegt. Das heißt also, daß E 600 für den Warmblüterorganismus stark toxisch ist (Schrader 1961).

2. Hydrolyse und Hemmwirkung des Paraoxon

Über die Frage, welches Enzym, bzw. welche Enzyme verantwortlich sind für die Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, sind von verschiedenen Seiten umfangreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Vornehmlich wurden dazu Serumfraktionen als Enzymquellen verwendet. Da jedoch die gleichen Serumenzyme fähig zu sein scheinen, auch Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich weniger über ihre Spezifität und Eigenschaften sagen, als etwa bei den Gewebsenzymen (Koelle 1963).

Mazur und Bodanski fanden 1946, daß sich im Plasma und in den Geweben von Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, das sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur zu einem extrem niedrigen Anteil an der Äthyl-Ester-Bindung, jedoch in entscheidendem Maße an der Phosphor-Fluor -Bindung gespalten.

Aldridge (1953 a) untersuchte Serumesterasen bei Kaninchen, Ratte und Pferd. Dabei fand er zwei Typen von Esterasen, die er

hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in A- und B-Estera-
sen einteilte. Die A-Estera-
sen werden durch E 600 nicht ge-
hemmt, während die B-Estera-
sen durch E 600 in einer Konzen-
tration von 10^{-7} bis 10^{-8} gehemmt werden. Er konnte das Vor-
kommen von A-Estera-
sen bei 10 verschiedenen Tierarten und
beim Menschen nachweisen. Bei der Ente verlief der Nachweis ne-
gativ.

In einer zweiten Arbeit fand Aldridge (1953 b), daß bei Zugabe
von E 600 - Lösung zu Kaninchenserum sich eine Gelbfärbung ein-
stellte, die durch p-Nitrophenol aus der Spaltung des Paraoxon
verursacht wurde. Aldridge zeigte, daß das E 600-spaltende
Ferment und die früher beschriebene A-Esterase identisch sind.
Das Enzym wurde E 600-Esterase genannt. Es war mit der sauren
und alkalischen Serumphosphatase nicht identisch. Innerhalb der ein-
zelnen Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten,
was seiner Meinung nach auf Proteinunterschiede zurückzuführen
ist.

Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester hydrolysierenden Estera-
sen (erythrocyte-acetocholinesterase, plasmaaromatic-esterase,
plasma-butyrylcholin-esterase, erythrocyte-aliesterase, erythro-
cyte-aromatic-esterase) des menschlichen Blutes scheinen nach
Mounter und Whittacker (1953) die erythrocyte-aromatic-
esterase und die plasma-aromatic-esterase wenn nicht identisch,
so doch extrem ähnlich zu sein. Nach jenen Autoren sind zudem bei-
de wahrscheinlich identisch mit der von Aldridge (1953 a; 1953 b)
gefundenen A-Esterase.

Augustinsson und Heimbürger (1954) berichten über ein, orga-
nische Phosphorverbindungen hydrolysierendes Ferment im Blut-
plasma bei 7 verschiedenen Tierarten und beim Menschen, das sie
Phosphoryl-Phosphatase nannten, und betonten, daß es nicht den
gewöhnlichen Phosphatasen zuzurechnen sei. Augustinsson und

Heimbürger (1954) fanden die besondere Bedeutung des Enzyms darin, daß sich bei dessen Anwesenheit die Inaktivierung der Cholinesterase durch Organophosphorverbindungen wesentlich verringerte, indem es offensichtlich in den Vergiftungsmechanismus eingreift. In einer Veröffentlichung von 1955 untersuchten Augustinsson und Heimbürger die Wirkung der Phosphoryl-Phosphatase auf durch Organophosphorverbindungen inaktivierte Cholinesterase. Die Ergebnisse legten die Vorstellung nahe, daß die Phosphorylphosphatase die inaktivierte Cholinesterase reaktivieren kann. Eine genauere Untersuchung der Phänomene zeigte allerdings, daß kein reaktivierender Effekt vorlag, sondern daß die Phosphorylphosphatase die fortschreitende Inaktivierung hemmt.

Es wird der im folgenden Schema aufgezeigte Reaktionsmechanismus angenommen (siehe Abb. 1, S. 7):

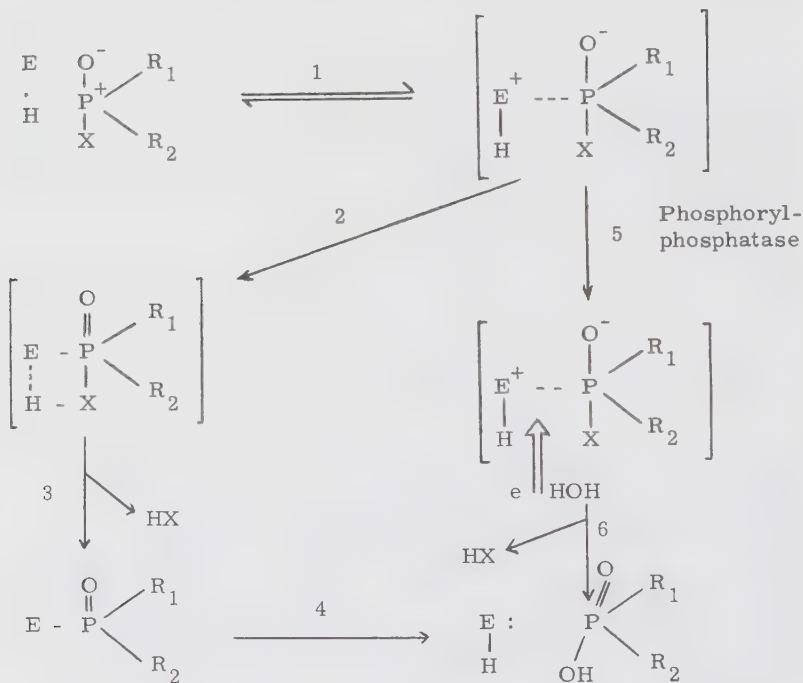
Das Enzym verbindet sich reversibel mit der Phosphorverbindung. Reaktion 2 und 3 stellen die eigentliche Hemmungsreaktion der organischen Phosphorverbindung dar. Die Reaktionen 5 und 6 zeigen die Dephosphorylierung des gehemmten Enzyms durch die Augustinsson'sche Phosphorylphosphatase bzw. durch eine noch nicht eindeutig bestimmte und isolierte Enzymgruppe. Gleichzeitig hält die Phosphorylphosphatase Reaktion 2 und 3 zurück und verhindert damit im Prinzip die irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase.

Abb. 1:

e = Phosphorylphosphatase E = Cholinesterase

X = F; CN; Arylrest; Pyrophosphat

R₁ = R₂ = Alkylgruppe (CH₃O; C₂H₅O)



Schema für den Reaktionsmechanismus der Inaktivierung der Cholinesterase durch Organophosphorverbindungen und der Wirkung der Phosphorylphosphatase auf diese Reaktion nach Augustinsson und Heimbürger 1955.

Der Wirkungsgrad der Phosphorylphosphatase hängt von der abgelaufenen Kontaktzeit zwischen der Cholinesterase und der Phosphorverbindung ab, sowie von den verschiedenen Gruppen (Alkyl-, Amidogruppe usw.) am Organophosphat.

Friedberg und Erdmann (1959) beobachteten, daß bei durch Paraoxon oder Parathion vergifteten Tierkadavern längere Zeit nach dem Tod eine höhere Cholinesteraseaktivität gemessen werden konnte, als kurz nach dem Tod. Obwohl bisher die Meinung vertreten wurde, daß die Enzymhemmung durch Phosphorsäureester nicht reversibel sei, mußte es zu einer spontanen Reaktivierung gekommen sein. Auch bei in vitro -Versuchen mit Pferdeserum wiesen die Autoren eine spontane Reaktivierung nach Paraoxonvergiftung nach. Die Möglichkeit, daß eine hohe, nicht enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit des Paraoxons der Grund für dieses Phänomen sei, oder, daß Paraoxon durch Cholinesterase schnell verbraucht wird, wurde durch verschiedene Experimente widerlegt. Die zuletzt genannte Möglichkeit wurde durch Versuche mit Rinder-serum, das keine Cholinesterase enthält, ausgeschlossen. Auch Friedberg und Erdmann machten für diese Reaktivierung die schon von Augustinsson und Heimbürger gefundene Phosphorylphosphatase verantwortlich.

Main (1960) versuchte, das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus Schafsserum rein darzustellen. Es gelang ihm, nach mehrfachen Reinigungsvorgängen mit Hilfe der Elektrophorese ein 80-95 %ig reines Enzym zu gewinnen, dessen Molekulargewicht zwischen 35 000 - 50 000 beträgt.

Main stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme der Michaelis-Konstanten fest, was er auf Paraoxonase-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein schienen.

Bei in vitro - Versuchen mit den Seren weißer Mäuse untersuchten Schaumann und Schiller (1961) die Inaktivierung von Cholin-esterasehemmern. Dabei gingen sie davon aus, daß bei der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind, eine Adsorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark adsorbiert.

1961 gelang es dann Erdös und Boggs, die Vermutung früherer Arbeiten zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxon-hydrolysierenden Aktivitäten in der Fraktion IV '1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden können, daß aber hierbei nicht die Gesamtaktivität des Nativserums erfaßt wird. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Aluminon (Aurintricarbonsäure) völlig auszuschalten war. Bei Mischung der Fraktionen IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich denjenigen mit normalem Serum.

In die gleiche Richtung gingen die Untersuchungen von Skrinjaric-Spoljar und Mitarbeitern (1968) mit menschlichem Serum. Als Substrat verwendeten sie Paraoxon und Armin (O-Äthyl, O-(p-nitrophenyl)-äthylphosphat), und es zeigte sich, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1 als auch in der Fraktion V eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substrate höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende Aktivität. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, daß mehr als ein Enzym

für die Hydrolyse von Paraoxon und Armin im menschlichen Serum existiert.

Nativseren aber enthalten nach Meinung von Skrinjaric - Spoljar und Mitarbeiter wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase-Aktivität", da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wohingegen die Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine größere Arminase- als Paraoxonase - Aktivität hervorbrachte.

Unabhängig davon hat auch Krisch (1968) nachgewiesen, daß menschliches Serum E 600 (Paraoxon) in einer Konzentration von 10^{-4} M fermentativ spaltet. In seinen Untersuchungen versuchte er eine nähere Charakterisierung dieser Enzymaktivität. Das pH-Optimum der Reaktion lag im stark alkalischen Bereich, etwa bei $\text{pH} = 11,2$.

Krisch verwandte Seren von 25 Männern und ebensovielen weiblichen Versuchspersonen und erhielt Paraoxon-spaltende Aktivitäten von 38 - 190 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol pro Minute und Liter Serum}$. Es fielen dabei zwei sich überlagernde Gruppen auf, welche sich durch den Wert der Esteraseaktivität unterschieden. Die Aktivität derselben Versuchspersonen schwankte nur innerhalb enger Grenzen. Veränderungen der Enzymaktivität unter pathologischen Bedingungen (bei Diabetes mellitus, Leukämie, Plasmozytom, Anämie, Herzinfarkt, Urämie, Carzinom usw.) ergaben sich nicht.

Dagegen hält es Krisch (1968) auf Grund seiner Ergebnisse für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede bei den jeweiligen Personen genetisch bedingt sind. Allerdings war eine genaue Zuordnung der einzelnen Gruppen wegen Überlagerungen nicht immer möglich.

Jener genetische Aspekt, der schon von Krisch geäußert wurde, taucht auch in den Untersuchungen von Geldmacher - v. Mallinckrodt,

Lindorf und Rabast (1969) wieder auf.

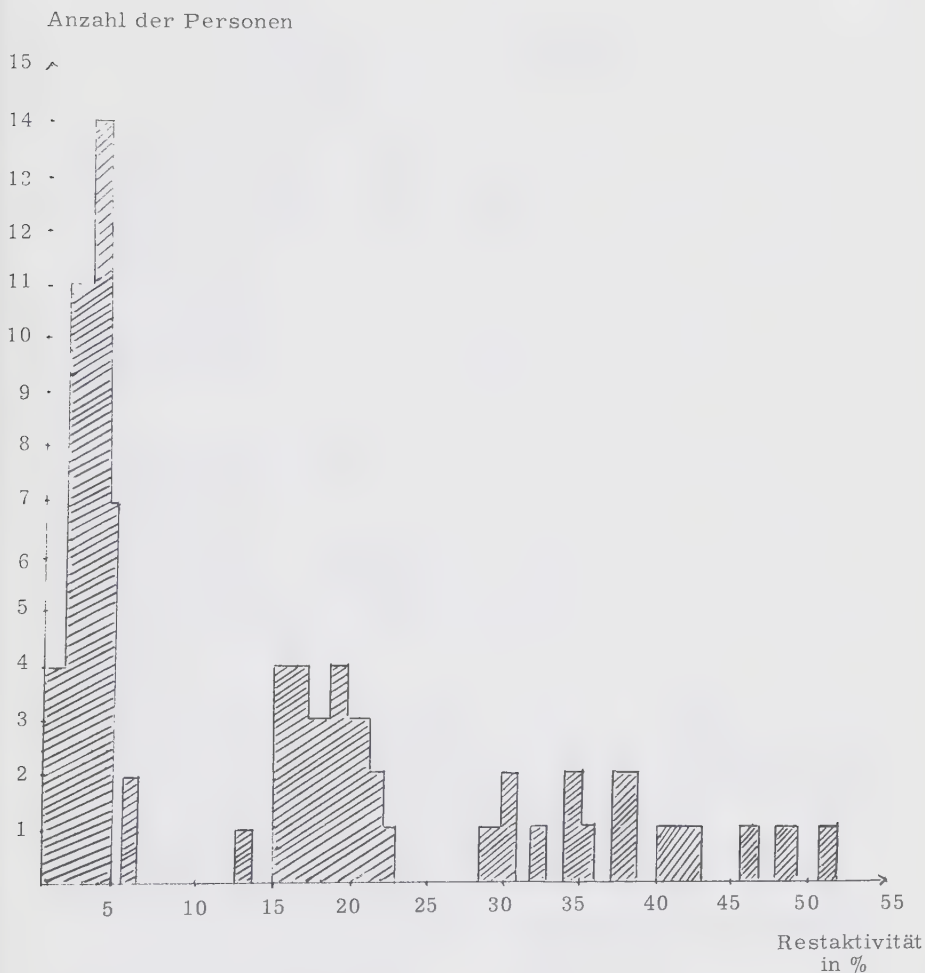
Sie stellten nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Enzyms durch den Hemmstoff E 600 fest. Sie fanden nach Inkubation von 75 Seren mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration eine Aufteilung in drei Gruppen mit niederer, mittlerer und hoher Restaktivität, unabhängig von der Ausgangsaktivität (siehe Tab. 1 und Abb. 2).

Tab. 1 :

Gruppe	Anzahl d. Personen	Restaktivität in % der Normalaktivität
I	38	0 - 5,5 nieder
II	22	13 - 21,0 mittel
III	15	29 - 51,0 hoch

Normalaktivität und Restaktivität der Serum-
Cholinesterase nach Vergiftung von 75 mensch-
lichen Serumproben mit E 600
($c = 3,2 \times 10^{-8} M$).

Abb. 2 :



Cholinesterase-Restaktivität von 75 menschlichen Seren nicht verwandter Probanden nach Vergiftung mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8} M$) nach Geldmacher - v. Mallinckrodt und Lindorf 1969.

3. Polymorphismus der Serumcholinesterase und Serumparaoxonase

Die Unterschiede der Cholinesterase - Restaktivität könnten durch einen Polymorphismus der Serumcholinesterase bedingt sein. Durch Messung der Enzymaktivität vor und nach Inkubation mit bestimmten Hemmstoffen ist bei den Cholinesterasen des menschlichen Serums schon mehrfach eine Zuordnung zu gut definierten Typen erfolgt (Whittacker 1968 a, Goedde, Doenicke und Altland 1967). Weitere Differenzierungsmöglichkeiten zeichnen sich ab: So hat Whittacker (1968, 1968 a) eine neue Einteilung durch unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Alkylalkohole, insbesondere Butylalkohol, vorgenommen, wobei sie eine Steuerung durch Gene für wahrscheinlich hält.

Kalow und Davies (1958) allerdings konnten bei Versuchen mit den Organophosphaten TEPP (Tetraäthylpyrophosphat) und DFP (O,O-Diisopropylfluorophosphat) in einem weiten Konzentrationsbereich keine Unterschiede in der Hemmbarkeit von normalem und dibucainresistentem Enzym bei menschlichen Serumproben feststellen.

Als zweite Möglichkeit muß ein Polymorphismus des E 600- spaltenden Enzyms in Betracht gezogen werden. Entsprechende Untersuchungen (Skrinjaric - Spoljar und Reiner 1968, Krisch 1968) wurden bereits erwähnt. Geldmacher - v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) hielten es deshalb für denkbar, daß während des Ablaufs der Hemmung der Serumcholinesterase in vitro durch Paraoxon in einer Konzentration von $3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ Unterschiede in der Aktivität der Serumparaoxonase die Paraoxonasekonzentration so variieren, daß unterschiedliche nicht vergiftete Restaktivitäten der Serumcholinesterase verbleiben.

Danach würde die Serumcholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweisen, sondern als empfindlicher Indikator für die verbleibende Paraoxonasekonzentration und die jeweilige Paraoxonaseaktivität dienen.

Bei 50 Versuchspersonen konnten Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. (1972) zeigen, daß zwischen der Serumcholinesteraserestaktivität, gemessen mit der Anti-ChE-Technik, und der Aktivität der Serumparaoxonase, spektrometrisch bestimmt nach Krisch (1968), eine hochsignifikante Relation ($r = +0,82$) besteht, in der Art, daß eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraoxonase-Aktivität entspricht, was diese Annahme bestätigt.

Allerdings konnte Krisch (1968) nur eine Aufteilung in 2 Gruppen finden, bei einer Paraoxonaseaktivität zwischen 38 und 190 U/l, während Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. mit der Methode nach Krisch 3 Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonaseaktivität bis über 500 U/l unterscheiden konnten.

Deshalb wurden von Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. 1973 257 Personen mit der Methode von Krisch (1968) untersucht. Bei diesem größeren Kollektiv konnten nun 3 Gruppen mit unterschiedlicher Aktivität abgegrenzt werden, wobei die Mittelwerte der Aktivitäten der einzelnen Gruppen sich mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit signifikant unterschieden. In den Grenzbereichen ist allerdings keine sichere Zuordnung mit dieser Methode möglich, worauf schon Krisch (1968) hinwies.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2:

n	Gruppe	Paraoxonase-Aktivität (U/l)	
		gemessene Werte	mittlere Aktivität mit Standardabweichung
132	I	30-189	97,1 + 36,3
97	II	190-350	262,3 + 41,4
28	III	> 350	449,6 + 79,4

Serumparaoxonaseaktivität von 257 menschlichen Seren (U/l) gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von Krisch (nach Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. 1973).

Daraufhin untersuchten Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. 1969 anschließend die Seren von 192 Personen mit der Anti-ChE - Technik, wobei unter Beibehaltung der übrigen Bedingungen das zur Messung der Serumcholinesteraseaktivität spezifische Butyrylcholin als Substrat verwendet wurde. Dabei war die Aufteilung in 3 gut getrennte Gruppen mit unterschiedlicher Serumcholinesteraseaktivität mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit gegeben (siehe Tabelle 3). Eine Überlappung der Gruppen war nicht zu finden. Die Anti-ChE-Methode erwies sich somit als geeignet, ein individuelles Serum einer der 3 Gruppen zuzuordnen.

Tabelle 3 :

n	Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität	
		gemessene Werte	mittlere Restaktivität mit Standardabweichung
128	I	0,0- 6,0	2,5 + 1,1
46	II	12,0-22,0	17,2 + 2,2
18	III	30,0-50,0	39,6 + 5,1

Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Normalaktivität bei 192 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}M$), gemessen mit der Anti-ChE - Technik (nach Geldmacher- v. Mallinckrodt et al., 1969)

Schon Krisch (1968) hatte vermutet, daß der von ihm bemerkte Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase genetisch bedingt sei. Deshalb untersuchten Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. (1973) 35 Familien mit insgesamt 52 Kindern nach der Anti-ChE-Technik. Die Ergebnisse lassen sich durch ein einfaches 2-Allele-System deuten.

Obwohl zur Zeit noch ungeklärt ist, ob die Aktivitätsunterschiede durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder durch das Vorliegen verschiedener Enzymproteine bedingt sind, und bei etwaigen qualitativen Unterschieden über die jeweilige elektrophoretische Beweglichkeit noch keine Aussage gemacht werden kann, wählten Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. (1973) folgende Bezeichnungen (siehe Tab. 4).

Tabelle 4 :

Serumcholin- esterase-Rest- aktivität. (Anti- ChE-Technik)	Serum- Paraoxonase- Aktivität	Paraoxonasetyp	
		früherer Name	neuer Name
Niedrig	Niedrig	Gruppe I	1-1
Mittel	Mittel	Gruppe II	2-1
Hoch	Hoch	Gruppe III	2-2

Gewählte Bezeichnungen für die Paraoxonasetypen

Das Ergebnis der Familienuntersuchungen ist in der folgenden Tabelle 5 wiedergegeben. Es widerspricht in keinem Fall dem angenommenen Modell und macht es wahrscheinlich, daß der Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase genetisch determiniert ist.

Tabelle 5 :

Eltern Paarungen			Familien n	Typ: 1-1 n	Kinder:	
					2-1 n	2-2 n
1-1	x	1-1	12	13	-	-
1-1	x	2-1	11	9	8	-
1-1	x	2-2	2	-	3	-
2-1	x	2-1	4	3	3	1
2-1	x	2-2	4	-	5	4
2-2	x	2-2	2	-	-	3
			35	25	19	8

Serumparaoxonasetypen bei 35 Familien mit 52 Kindern
(Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. 1973).

B. Problemstellung

Krisch hatte 1968 an Hand seiner Versuche die Vermutung geäußert, daß der Polymorphismus der menschliche Serumparaoxonase genetisch bedingt sei. Geldmacher - v. Mallinckrodt, Petenyi, Flügel, Lindorf, Fischer und Hiller (1973) untersuchten 35 Familien mit 52 Kindern aus unterschiedlichen Regionen nach der Anti-ChE -Technik und stellten gleichfalls fest, daß der Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase wahrscheinlich genetisch bedingt sei und einem 2 Allele- Modell folge.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun die Seren von 13 Familien aus dem Raum Erlangen mit 24 Kindern auf ihre Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 unter genau definierten Bedingungen untersucht werden, um weiter zu prüfen, ob der Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase genetisch bedingt ist und welchem Vererbungsschema er folgt, sowie auch, um einen Beitrag zu der Frage zu liefern, ob regionale Unterschiede in der Verteilung vorliegen.

C. Experimentelle Untersuchungen

1. Versuchspersonen

Zur Verfügung stellten sich 13 Familien mit insgesamt 24 Kindern aus dem Raum Erlangen, die in den letzten Jahren weder ernstere Krankheiten noch chronische Leiden hatten.

2. Methodik zur Messung der Serumcholinesterase-Restaktivität mit Butyrylcholinjodid als Substrat in der Warburg-Apparatur

Gewinnung des Serums:

Den einzelnen Familienmitgliedern wurden ca. 8 ml Blut mit Venülen der Firma Boehringer aus den Venen entnommen. Das Blut wurde möglichst noch am gleichen Tag 15 min bei 1600 U/min zentrifugiert und das Serum anschließend abpipettiert. Das abgetrennte Serum wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Messungen wurden dann innerhalb möglichst kurzer Zeit, d.h. in einem Zeitraum von ca. 1 - 3 Tagen vorgenommen. Lindorf (1971) hatte gezeigt, daß innerhalb dieser Zeit kein Abfall der Paraoxonaseaktivität eintritt.

Angewandtes Meßverfahren:

Die Serumcholinesterase-Restaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur vom Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, (siehe Abb. 3, S. 22) mit der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der Modifikation von Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 für die Aktivitätsmessungen wurden auf die Methode von Geldmacher - v. Mallinckrodt, Lindorf, Petenyi, Flügel, Fischer und Hiller abgestimmt.

Inkubation mit E 600:

Für die Vergiftung der Seren wurde 1 μ l E 600 auf 90 ml Aqua bidest. gegeben. Dann wurden 20 μ l dieser Lösung zu 27 ml Verdünnungslösung gegeben. Diese Verdünnungslösung war eine Lösung aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung. Die E 600-Konzentration war $3,2 \times 10^{-8}$ M. Diese Lösung von 1 μ l E 600 auf 90 ml bidest. wurde gut geschüttelt.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum im Reagenzglas mit 1,35 ml der entsprechenden E 600-haltigen Verdünnungslösung vermischt. Daneben wurde in einem weiteren Reagenzglas Serum nur mit Verdünnungslösung versetzt. Nun wurden 2 Anhangsbirnen mit je 0,5 ml des vergifteten Serums und je 2 Anhangsbirnen mit je 0,5 ml des nicht vergifteten Serums gefüllt. In dem Hauptraum der Warburggefäße befanden sich je 1,5 ml einer 0,54 %igen, wäßrigen Lösung von Butyrylcholinjodid.

Nachdem nun die Warburggefäße alle gefüllt waren, wurden sie an das Manometer angeschlossen und in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch von 5 % CO_2 und 95 % N_2 20 min lang begast.

Nach dem Begasen wurde noch solange bei $+37^\circ\text{C}$ inkubiert, bis eine Gesamtinkubationsdauer von 60 min erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation bei $\text{pH} = 7,7$ (Süllmann 1964).

Messung der Cholinesteraseaktivität:

Nach beendeter Inkubation wurden die Serumverdünnungen und die vergifteten Seren aus den Anhangsbirnen in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei $\text{pH} = 7,2$ (Süllmann 1964).

Es wurde nun bei geöffneten Hähnen 3 min bei einer Schüttelfrequenz von 100/min geschüttelt. Anschließend wurde die Manometerdifferenz abgelesen und die Hähne geschlossen. Der Manometerstand wurde dann jeweils nach 15 min und 30 min abgelesen.

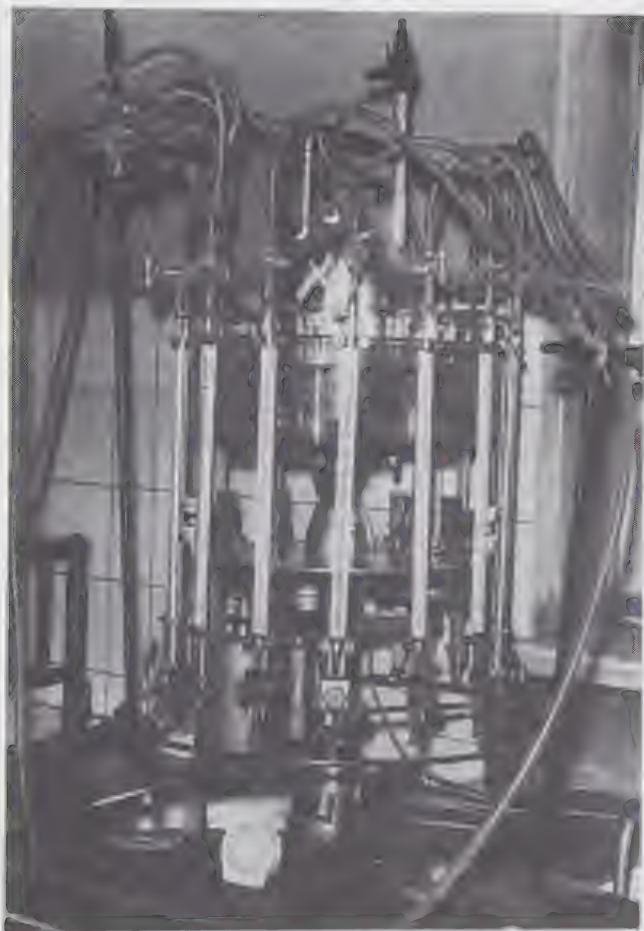
Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne E 600 auf ihre Restaktivität getestet.

Bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat, im Gegensatz zu Acetylcholinjodid, beträgt die CO_2 -Entwicklung mehr als das Doppelte, und die Meßdauer wird auf die Hälfte der Zeit verkürzt. Außerdem wird Butyrylcholinjodid nicht von der Erythrozyten-Cholinesterase gespalten und kann so auch bei leicht hämolytischen Seren verwendet werden.

Zur Kontrolle liefen pro Versuch 2 Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirnen Verdünnungslösung und der Hauptraum Butyrylcholinjodidlösung enthielt, um die Eigenhydrolyse des Substrats zu erfassen.

Diese Doppelbestimmung der Seren wurde zweimal durchgeführt, so daß in 2 Versuchsabläufen 3 Seren mit jeweils insgesamt 4 Leerwerten, 4 vergifteten und 4 unvergifteten Ansätzen auf ihre Restaktivität geprüft wurden. Dann wurden die 30 min-Werte der Doppelmessung mit der entsprechenden Manometerkonstanten (Süllmann 1964) multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetische Mittel für beide Wertepaare gebildet, und der Leerwert vom Wert der Fermentmessung abgezogen. Auf die gleiche Weise wurde der 2. Versuchsablauf ausgewertet und aus beiden Ergebnissen wiederum das arithmetische Mittel gebildet.

Abb. 3 :



Warburg-Apparatur vom Typ V 85 der Firma Braun,
Melsungen.

3. Versuchsergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Dabei wurden die 3 Paraoxonasetypen in der folgenden Weise festgelegt:

Restaktivität in % der Normalaktivität		
0,0 - 6,5	nieder	
10,0 - 28,0	mittel	
30,0 - 49,0	hoch	

Tabelle 6:

Ergebnisse der Messungen der Aktivität und Restaktivität der Serumcholinesterase von 13 Familien mit 24 Kindern aus dem Raum Erlangen, vor und nach Vergiftung der Seren mit E 600.

(V = Vater, M = Mutter, K = Kind)

Familie	Familienmitglied		Geburtsjahr	Ausgangsaktivität $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$	Restaktivität %	Paraoxonasetyp
Hofmann	V	Hans	1923	173	4,8	1-1
	M	Annem.	1920	217	33,4	2-2
	K	Ulrike	1952	158	24,7	2-1
Eckstein	V	Hans	1926	163	23,9	2-1
	M	Erna	1931	162	3,5	1-1
	K	Helga	1952	122	17,3	2-1
	K	Gerda	1956	138	3,3	1-1
	K	Christa	1962	177	2,7	1-1

Familie	Familien- mitglied		Geburts- jahr	Ausgangs- aktivität $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$	Rest- aktivi- tät %	Paraoxo- nasetyp
Vestner	V	Hans	1929	182	15,3	2-1
	M	Liselo.	1936	158	4,1	1-1
	K	Ingrid	1958	134	14,1	2-1
	K	Irene	1961	146	5,5	1-1
Gsell	V	Christian	1925	160	19,0	2-1
	M	Annelise	1924	155	36,7	2-2
	K	Helmut	1954	149	18,4	2-1
	K	Rosemar.	1951	162	17,4	2-1
Bloß	V	Hans	1918	202	32,1	2-2
	M	Betty	1920	227	6,1	1-1
	K	Hannel.	1954	240	18,3	2-1
	K	Herbert	1949	229	24,7	2-1
Böttcher	V	Fritz	1920	210	44,1	2-2
	M	Anna	1923	138	48,6	2-2
	K	Gisela	1947	206	43,7	2-2
Albert	V	Harald	1943	226	2,4	1-1
	M	Heidi	1944	209	2,8	1-1
	K	Doris	1964	212	2,9	1-1
Gottschalk	V	Ulrich	1927	178	3,6	1-1
	M	Anna	1931	189	34,3	2-2
	K	Inge	1958	163	22,7	2-1
	K	Gerlinde	1961	196	24,9	2-1
	K	Harald	1968	181	24,3	2-1

Familie		Familien- mitglied	Geburts- jahr	Ausgangs- aktivität $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$	Rest- aktivi- tät %	Paraoxo- nasety p
Hochleitner	V	Karl	1912	197	40,3	2-2
	M	Ruth	1917	170	24,8	2-1
	K	Reinhard	1949	182	28,7	2-1
	K	Ilse	1952	179	24,3	2-1
	K	Hermann	1952	204	39,7	2-2
Bloß	V	Herbert	1949	229	24,7	2-1
	M	Gisela	1950	198	24,7	2-1
	K	Thorsten	1970	202	23,6	2-1
Sturm	V	Fritz	1910	154	13,5	2-1
	M	Ingeborg	1914	169	13,3	2-1
	K	Rainer	1950	145	17,1	2-1
	K	Rosemarie	1952	162	12,7	2-1
Roeder	V	Ulrich	1949	196	3,8	1-1
	M	Hilde	1951	156	23,3	2-1
	K	Inge	1969	178	11,9	2-1
Emmert	V	Friedrich	1918	211	5,1	1-1
	M	Emma	1927	157	24,7	2-1
	K	Frieder	1949	197	5,6	1-1
	K	Walter	1951	186	15,6	2-1

Somit ergeben sich den Versuchsergebnissen zufolge folgende Kombinationen (Tab. 7).

Tabelle 7 :

Eltern Paarungen			Familien	Kinder Paraoxonasetyp		
				1-1	2-1	2-2
			n	n	n	n
1-1	x	1-1	1	1	-	-
1-1	x	2-1	4	4	4	-
1-1	x	2-2	3	-	6	-
2-1	x	2-1	2	-	3	-
2-1	x	2-2	2	-	4	1
2-2	x	2-2	1	-	-	1
			13	5	17	2

Serum - Paraoxonase - Typen bei 13 Familien mit
insgesamt 24 Kindern aus dem Raum Erlangen

D. Diskussion und Zusammenfassung

Schon Krisch (1968) hatte die Vermutung geäußert, daß der von ihm bemerkte Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase genetisch bedingt sei.

Wir untersuchten nun 13 Familien mit 24 Kindern aus dem Raum Erlangen mit der Anti-ChE -Technik zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase. Dabei fanden wir bei den 13 Familien ein 2-Allele-Modell vor, was schon Krisch 1968 und Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. 1973 vermutet hatten.

Auch Behringer und Bartel bestätigten das 2-Allele- Modell an Hand ihrer Untersuchungen an Familien aus dem Raum Württemberg und Norddeutschland.

Bei den 13 Familien aus dem Raum Erlangen waren alle Kombinationen, die sich aus den 3 verschiedenen Paraoxonase - Typen ergeben können, vertreten.

Am häufigsten trat die Paarung 1-1 x 2-1 (bei 4 Familien) auf, wobei 4 Kinder dem Paraoxonasetyp 1-1 und 4 Kinder dem Typ 2-1 entsprachen. An zweiter Stelle folgte die Kombination 1-1 x 2-2 . Hierbei wurde für 6 Kinder der Paraoxonasetyp 2-1 ermittelt. Den dritten Platz teilten sich mit jeweils 2 Familien die Paarungen 2-1 x 2-1 mit 3 Kindern mittleren Typs und 2-1 x 2-2 mit 4 Kindern mittleren und einem Kind hohen Typs. Alle anderen Kombinationen waren nur einmal vertreten. Daraus ergibt sich also, daß in unserem Untersuchungsgut Familien mit der Kombination 1-1 x 2-1 und 1-1 x 2-2 überwiegen, wobei bei den Kindern der Paraoxonasetyp 2-1 vorherrscht. Besonders erwähnenswert sei noch, daß bei 6 der 13 Familien jeweils ein Elternteil dem Paraoxonasetyp 2-2 angehörte, was besondere Beachtung

verdient, da dieser Typ relativ selten ist. Allerdings können 13 Familien weder für die Verteilung der Paarungen, noch für die Bestätigung des 2-Allele-Modells als repräsentativ gelten. Weitere Untersuchungen sind deshalb wünschenswert.

E. Literaturverzeichnis

ALDRIDGE, W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953a)

ALDRIDGE, W.N.:

Serum esterases. 2. An enzyme, hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-Esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953b)

AMMON, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflüg. Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

AMMON, R. und F.J. ZAPP:

Die einfache klinisch-chemische Methode zum Nachweis von Cholinesterase im Serum.

Klin. Wschr. 33, 759 (1955)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954a)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethylamidoethoxyphosphoryl cyanide (tabun).

Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954b)

AUGUSTINSSON, K. -B. and G. HEIMBÜRGER:

II. Analysis of reaction products in experiments with Tabun and some properties of blood plasma tabunase.

Acta Chem. Scand. 8, 763 (1954c)

AUGUSTINSSON, K. -B. and G. HEIMBÜRGER:

III. Effect of cholinesterase inhibition and inhibition of cholinesterase in the presence of tabunase.

Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954d)

AUGUSTINSSON, K. -B. and G. HEIMBÜRGER:

IV. Specifity studies.

Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954e)

AUGUSTINSSON, K. -B. and G. HEIMBÜRGER:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds V-VII.

Acta Chem. Scand. 9, 310, 383 (1955)

11, 1371 (1957)

BARTEL, M.:

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

BEHRINGER K.:

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

ERDÖS, E.G. and L.E. BOGGS:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature 190, 716 (1961)

FRIEDBERGER, K.D. und W.D. ERDMANN:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 237, 1 (1959)

FRIEDBERG, K.D. und F. SAKAI:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten
(E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines
fermentreaktivierenden Antidots (PAM).

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M. und H. LINDORF:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit
Alkylphosphaten.

Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechts-
medizin in Berlin 1969

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H. und
U. RABAST:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen
mit E 600.

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W.,
PETENYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H. und H. METZNER:
Korrelation der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholin-
esterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden
Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., PETENYI, M., FLÜ-
GEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, H.,
NIRSCHL, H. und O. RENNER:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, T. und T. HILLER:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).
Humangenetik 17, 331 (1973)

GOEDDE, H.W. DOENICKE, A. und K. ALTLAND:
Pseudocholinesterasen.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1967

KALOW, W. and R.C. DAVIES:
The activity of various esterase inhibitors towards atypical human
serum cholinesterase.
Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1958)

KIMMERLE, G. und D. LORKE:
Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester.
Pflanzenschutznachrichten Bayer 21, 111 (1968)

KOELLE, G.B. :
Cholinesterase and anticholinesterase agents.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk XV.
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)

KRISCH, K. :
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600)
durch menschliches Serum.
Z. Klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

LINDORF, H.H. :
Untersuchungen zur Ursache der unterschiedlichen Reaktion der
menschlichen Serum-Cholinesterase mit E 600.
Dissertation Erlangen (1971)

MAIN, A.R.:

Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases based on inhibition by organophosphates.

J. biol. Chem. 244, 829 (1969)

MAIN, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

MAZUR, A. and O. BODANSKY:

The mechanism of in vitro inhibition of cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163, 261 (1946a)

MAZUR, A. and O. BODANSKY:

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl-fluorophosphates.

J. Biol. Chem. 164, 271 (1946b)

MOUNTER, L.A. and V.P. WHITTAKER:

The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases.

Biochem. J. 54, 551 (1953)

SCHAUMANN, W. und M. SCHILLER:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.

Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)

SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester.

Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1963)

SKRINJARIC SPOLJAR, M. and E. REINER:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.

Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

SÜLLMANN, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels. In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse,

herausgeg. von K. Lang und E. Lehnartz, Bd. VIa, Teil A.

Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York, Springer Verlag (1964)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die Übernahme des Korreferates zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung dieses Themas, ihre ungewöhnlich große Hilfsbereitschaft und für den zu jeder Zeit freundlich erteilten Rat.

Herrn Dr. Lorke von der Firma BAYER bin ich für das zur Verfügung gestellte E 600 zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Geboren : 17. September 1952 in Oberwellitzleithen

Eltern : Hans Eckstein, Landwirt
Erna Eckstein, geb. Roth

Schulbildung : 1958 - 1962 Volksschule in Altdorf
1962 - 1971 Leibniz-Gymnasium in Altdorf
1971 Abitur am neusprachlichen Zweig des
Leibniz-Gymnasiums in Altdorf

Studium : Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg im W.S. 1971/72
Vorphysikum August 1972
Physikum April 1974
Staatsexamen: 1. Dezember 1976

Erlangen, im Dezember 1976

Helga Eckstein

Buchdruck - Offsetdruck

Karl Döres, 852 Erlangen, Jägerstr. 3 · Tel. 2 15 21